



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01380

(22) Data de depozit: 21.12.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• DINU SORINA,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• CONSTANTINESCU FLORICA,
STR. EMANOIL PORUMBARU NR. 67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• SICUIA OANA, STR. VICINA NR. 3, BL. 33,
SC. 3, AP. 153, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **TULPINĂ DE SERRATIA PLYMUTHICA CU ACȚIUNI
MULTIPLE ASUPRA PLANTELOR DE CULTURĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Serratia plymuthica* Ps33, cu număr de depozit NCAIM (P) B001366, care este destinată aplicării ca bioinoculant pentru protecția culturilor agricole și pentru biofortifierea recoltei de cereale-boabe în zonele cu deficit de seleniu. Tulpina de *Serratia plymuthica* Ps33 are acțiuni de protecție a plantelor de cultură față de ciuperci fitopatogene de sol, și acțiune antagonistă față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit,

stimulează dezvoltarea plantelor de grâu prin producerea de compuși volatili și solubilizarea fosforului, biodisponibilizează seleniul și favorizează acumularea acestuia în boabe, prezintă mobilitate ridicată și formează biofilme care colonizează suprafețele organelor plantelor și rezistă la factorii adverși de mediu.

Revendicări: 1



TULPINĂ DE *SERRATIA PLYMUTHICA* CU ACȚIUNI MULTIPLE ASUPRA PLANTELOR DE CULTURĂ

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Serratia plymuthica*, izolată din rizosfera de grâu, caracterizată prin acțiuni benefice multiple asupra plantelor de cultură, destinată aplicării ca bioinoculant pentru protecția culturilor agricole și pentru biofortifierea recoltei de cereale-boabe în zonele cu deficit de seleniu.

Sunt cunoscute o serie întreagă de tulpini de *Serratia* care sunt utile pentru protecția plantelor de cultură împotriva agenților de dăunare. Brevetul US 5869038 descrie tulpini de *Serratia* (*S. plymuthica* CL 43, depozitată la National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, cu numărul NCIMB 40493, și *S. liquefaciens* CL 80 NCIMB 40492) care protejează legumele frunzoase (salată, varză) împotriva ciupercilor producătoare de putregaiuri (*Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*). Brevetul US 6660263 prezintă tulpina *Serratia marcescens* MSU-97 (înregistrată la Centraalbureau voor Schimmel Cultures sub numărul CBS 112860) producătoare de oocidină și care este activă față de o serie de ciuperci fitopatogene din sol. Brevetul WO/2004/049808 expune tulpina de *Serratia marcescens* PRI-2A (depozitată la Centraalbureau voor Schimmelcultures cu numărul CBS 110243), care este activă față de următoarele categorii de agenți de dăunare: bacterii fitopatogene din genul *Ralstonia*; ciuperci fitopatogene (*Rhizoctonia solani*); insecte (tripși, ca de ex. *Frankliniella occidentalis*); acarieni (*Tetranychus urticae*). Cererea de brevet US 20030130121 se referă la tulpina A153 de *Serratia plymuthica* (depozitată la National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria NCIMB cu numărul 40398) care produce haterumalide A, B, E și X (și derivați) și care inhibă creșterea unor ciuperci fitopatogene ca *Sclerotinia sclerotiorum* și a unor buruieni: *Chaenopodium album*, *Thlapsi arvensis*, *Stellaria media*, *Fumaria officinalis*.

Nu s-au descris până în prezent tulpini de *Serratia* care să prezinte concomitent antagonism față de fitopatogeni și capacitate de a stimula preluarea microelementelor de către plante, în special seleniu.

Nici una dintre tulpinile de *Serratia* revendicate prin brevetele din literatura de specialitate nu prezintă descrieri privind inocuitatea pentru organisme nețintă, deși o serie de tulpini din genul *Serratia* s-au dovedit a fi patogeni oportuniști pentru om (Eisenstein, 2009, cap. 225 Enterobacteriaceae, în Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E., Eds. *Principles and practice of infectious disease*, ediția a 7-a, Elsevier Scientific, Oxford, 2009, pg. 1848-



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2010 01380
Data depozit	21-12-2010

1860). Patogenitatea pentru om este datorată producerii de hemolizine (Kurz *et al.*, 2003, The EMBO Journal, 22:1451–1460, Shimuta *et al.*, 2009, BMC Microbiology, 9:261) astfel încât caracterizarea tulpinilor de *Serratia* propuse pentru utilizare în agricultură ar trebui să includă teste de inocuitate pentru organisme - neșintă.

Tulpina descrisă în prezenta invenție, înregistrată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, cu numărul NCAIM (P) B 001366, are acțiuni benefice multiple asupra plantelor de cultură, inclusiv de protecție față de anumiți agenți fitopatogeni și de stimulare a preluării seleniului de către plantele de grâu și porumb, și nu prezintă patogenitate pentru organisme neșintă.

Tulpina de *Serratia plymuthica* Ps33 descrisă în prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- Creștere abundentă pe mediile uzual folosite pentru cultivarea proteobacteriilor;
- Mobilitate ridicată, care permite colonizarea rapidă a diferitelor suprafețe ale organelor plantelor;
- Formarea de structuri de tip biofilme pe diferitele suprafețe (inclusiv pe cele delimitate de organele subterane ale plantelor), ceea ce asigură o mai mare rezistență față de factorii de mediu și, implicit, o competență saprofitică superioară în rizosferă;
- Antagonism pentru o serie de ciuperci fitopatogene de sol ceea ce permite folosirea ca bioinoculant pentru protecția primelor stadii ale plantelor de cultură față de acești agenți fitopatogeni de sol;
- Antagonism pentru bacteriile care produc boli în timpul înfloritului (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* etc.);
- Producere de compuși volatili care stimulează creșterea plantelor;
- Îmbunătățirea nutriției plantelor prin solubilizarea fosforului insolubil anorganic prin producere de acizi organici, solubilizarea fosforului insolubil organic (săruri ale acidului fitic) prin producere de fitaze, niodisponibilizarea seleniului și stimularea preluării și acumulării lui de către plantele de grâu și porumb.

Prezenta invenție se ilustrează cu exemplul prezent mai jos.

Exemplu. Tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* a fost obținută la Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Protecția Plantelor, București, din rizosfera unor plante de grâu (*Triticum aestivum* cv. *Boema*).



Pentru izolare s-a folosit mediul Nutrient agar cu următoarea compoziție: peptonă – 5g, beef extract – 3g, agar – 18g, la 1000 ml apa distilata; pH 6,8-7,2. Purificarea bacteriei s-a realizat pe mediul Luria-Bertani (LB) agarizat cu următoarea compoziție: bacto-triptonă - 10g; extract de drojdii - 5g; NaCl 5g; agar 15 g; apa distilata până la 1000ml; pH corectat la 7,4 cu soluții de NaOH 5M sau HCl 1M. Pentru cultivare s-a folosit mediu LB lichid, bacteriile fiind crescute 1... 2 zile la temperatura de 28°C.

Această tulpină a fost selectată dintr-o colecție de peste 150 izolate de bacili gram negativi, pe baza:

- acțiunii antagoniste *in vitro* și acțiunii de protecție *in vivo* a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*, *Verticillium dahliae*);
- acțiunii antagoniste *in vitro* și *in situ* față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *pseudomonasuri* ice⁺);
- producerii de compuși volatili cu acțiune de stimulare a creșterii plantelor;
- acțiunii de solubilizare a fosforului din formele sale insolubile, organice și anorganice;
- acțiunii de stimulare a germinației grâului și dezvoltării plantulelor de grâu, ca și de stimulare a preluării și acumulării seleniului de către plantele de grâu și porumb;
- inocuitate în testul pe *Galleria mellonella*.

În vederea încadrării taxonomice tulpina Ps33 a fost caracterizată din punct de vedere morfologic (tabel 1), biochimic - fiziologic (tabel 2) și pe baza secvenței 16S rADN (tab.3).

Tab. 1. Morfologia coloniilor și celulelor de *Serratia plymuthica* Ps33 pe mediu LB agarizat după cultivare timp de 24 ore.

Caractere morfologice specifice pentru <i>Serratia plymuthica</i> Ps33	
Colonia	<i>forma</i> : circulară
	<i>aspectul suprafeței</i> : netedă, convexă
	<i>transparenta</i> : translucidă
	<i>culoarea</i> : alb-gălbui
Celule:	<i>forma</i> : bastonaș
	<i>dimensiuni</i> : 0,5 – 0,8 x 0,9 – 2,0 μm
	<i>aranjament flagelar</i> : peritrich



Tab. 2. Caracteristicile fiziologice ale tulpinii Ps33.

Testul biochimic	Ps 33
Reacția Gram	-
Reacția Voges-Proskauer	+
Hidroliza amidonului	+
Hidroliza gelatinei	+
Reducerea NO ₃ →NO ₂	+
Creștere anaeroba	-
Chitinază	+
Oxidază	-
Pectinază	-
Catalaza	+
Lecitinază	+
Sursa de carbon:	
adonitol	-
arabinoză	+
meliboză	+
D-arabitol	-
trehaloza	+
zaharoza	+
maltoza	+
glucoza	+
xiloza	+
manoza	+
fructoza	+
sorbitol	+
manitol	+
inozitol	+
glicerol	+
meso-eritritol	-
Acidifica:	
adonitol	-
glucoza	+
zaharoza	+
maltoza	+
fructoza	+
arabinoza	+
manitol	+
rafinoza	+
celobioza	+
ramnoza	-
sorbitol	-

Identificarea pe baza secvenței 16S rADN s-a realizat prin aplicarea unui protocol de lucru caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure – colonii izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului bacterian; electroforeză în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 16S rADN prin tehnica PCR și electroforeză în gel; purificarea ADN-



Altescu

ului ribozomal; precipitarea și uscarea ADN-ului ribozomal. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind programul *CHROMAS 2.33* (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene *NCBI* (National Center for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool). Pe baza secvenței de 1299 perechi baze din secvența 16S rADN tulpina Ps33 prezintă o asemănare de 99,92% cu tulpina *Serratia plymuthica* G3 izolată din rizosfera de grâu, număr acces EU344964, respectiv 99,84% cu tulpina *Serratia plymuthica* AY394724 înalt producătoare de biofilme (Van Houdt *et al*, 2005, *FEMS Microbiol Lett.* 15, 246:265-272). Secvența 16S rADN a tulpinii Ps33 a fost depusă la *NCBI*, *GenBank*, sub numărul EU1181134.

Tab. 3. Secvența 16 S rADN pentru tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica*.

Tulpina	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN
Ps33	GGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGG AGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGA CCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGG GATTAGCTAGTAGGTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTGACT GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTCA GCGAGGAGGAAGGGTAATGTGTTAATAGCACATTGCATTGACGTTACTCGC AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG GTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTT GTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAA CTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCT TGAGGCGTGGCTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTA CGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG TGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG ACATCCAGAGAAGTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGA CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGT CCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGA ACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA TACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTC GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA GTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG

Testarea activității antagoniste *in vitro* a tulpinii Ps33 a fost efectuată pe mediul cu cartof dextroza agar (CGA). Tulpina Ps33 (dintr-o cultura de 24 ore) a fost însămânțată pe mediu prin strierea cu ansa a unei linii drepte o distanță de



3 cm de o rondea calibrata de miceliu (5mm) din cele opt ciuperci studiate. Plăcile Petri astfel înșămânțate au fost incubate la 28°C și analizate în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 ore. Experiența a fost repetată de trei ori. Rezultatele (tab.4) au demonstrat că tulpina Ps33 produce metaboliți antifungici care au inhibat dezvoltarea tuturor ciupercilor luate în studiu. Cea mai mare zonă de inhibiție s-a înregistrat față de ciupercile producătoare de mucegaiuri *Botrytis cinerea* (7 mm), *Sclerotinia sclerotiorum* (6 mm) și *Sclerotinia bataticola* (5 mm). Acțiunea biologică este semnificativă și față de *R. solani* (4 mm), *Verticillium dahliae* (4 mm), *F. oxisporum* f. sp. *radicis lycopersici* (3,5 mm). Bacteria prezintă un antagonism moderat și față de *Fusarium graminearum* (2,5 mm) și *Alternaria* spp (1,5mm).

Tab. 4. Testarea *in vitro* a activității antagoniste a tulpinii de *Serratia plymuthica* Ps33 asupra creșterii miceliene a unor ciuperci fitopatogene (zona de inhibiție la 72 h, mm)*.

Ciuperca fitopatogenă	Zona de inhibiție (mm) indusa de tulpina Ps33
<i>Rhizoctonia solani</i>	4
<i>Alternaria</i> spp.	1,5
<i>Fusarium graminearum</i>	2,5
<i>Fusarium oxisporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	3,5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	6
<i>Sclerotium bataticola</i>	5
<i>Botrytis cinerea</i>	7
<i>Verticillium dahliae</i>	4

*media a 5 determinări

Tulpina Ps33 a fost testată în condiții controlate în ceea ce privește eficacitatea în combaterea ciupercilor fitopatogene de sol (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxisporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*), care atacă frecvent în stadiul de plantulă și produc pagube. Pentru efectuarea testului s-au utilizat semințe de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Unirea. Semințele dezinfectate în prealabil cu soluție 4% hipoclorit, au fost imersate într-un amestec constând din suspensie celulară bacteriană cu titrul de 1×10^9 ufc/ml și 1% metilceluloză în tampon fosfat (w/v). Ciupercile fitopatogene au fost crescute pe mediul CGA (Difco) în scopul obținerii unei creșteri uniforme a miceliului. După incubare 4-5 zile la 28°C, miceliul a fost



Heese

mărunțit și utilizat pentru inocularea a 200 ml mediu Czapec-Dox (CDA, Difco) distribuit în flacoane Erlenmeyer. Flacoanele însămânțate au fost incubate timp de 4-5 zile la 28°C. Sporii au fost separați de miceliu prin filtrare, utilizând o pânză sterilă. Semințele de tomate bacterizate au fost semănate în pungi de material plastic sterile (cyg - Mega International) și plasate în camera de creștere, în condiții de temperatură și umiditate corespunzătoare (21...23°C, 70% umiditate relativă). Fiecare pungă a fost umectată cu 2 ml soluție nutritivă Hoagland, infectată cu spori în concentrație de 10⁶ spori/litru soluție. În variantele martor netratat pentru umectare s-a utilizat doar soluție nutritivă Hoagland. Semințele din varianta martor chimic au fost tratate cu Tiradin 70 PU (doză echivalentă a 4 g/kg). Pungile au fost reumectate la fiecare 2 zile pe parcursul a 4 săptămâni, folosindu-se pentru reumectare soluții nutritive sterile.

După 4 săptămâni, plantele au fost analizate în privința simptomelor caracteristice fiecărei boli, cu precădere brunificarea coletului și a părții superioare a rădăcinilor. Eficacitatea tratamentului cu tulpina Ps33 de *S. plymuthica* în combaterea bolilor complexului de răsărire la tomate este prezentată în tab. 5.

Tab. 5. Eficacitatea tulpinii Ps33 în combaterea bolilor complexului de răsărire la cultura de tomate (cv. Unirea).

Varianta tratament	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)	% plante sănătoase răsărite	Eficacitatea (%)
<i>Inocul fungic</i>	<i>R.F.P.*</i>		<i>S. s.*</i>		<i>S.b.*</i>	
Martor netratat	45	-	50	-	53	
Tiradin 70 PU (4g/kg)	93	87	98	96	90	79
Ps33	95	89	98	96	88	74

*R.F.P. - *Rhizoctonia solani*- *Fusarium oxysporum*- *Pythium ultimum*; S.s.-*Sclerotinia sclerotiorum*; S.b.- *Sclerotium bataticola*

Tratamentul semințelor cu tulpina Ps33 a determinat obținerea unei eficacități mai mari (89%) în varianta infectată cu complexul ciupercilor fitopatogene de sol R.F.P. decât cea obținută în varianta tratată cu Tiradin (87%). Tulpina testată prezintă o semnificativă acțiune de protecție a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol.

S-a demonstrat că bacteriile Ps33 prezintă antagonism *in vitro* și *in situ* și față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas ice*⁺).



Testul *in vitro* s-a efectuat pe mediu LB agarizat. Tulpinile fitopatogene folosite au fost *E. amylovora* NCAIM B 01108 și *Pseudomonas syringae* ATCC 53543. Tulpinile, înprospătate cu 24 ore înainte de efectuarea testului, au fost însămânțate simultan în placi petri cu mediu LB agarizat, tulpinile fitopatogene fiind striate pe mijlocul plăcii, iar tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* perpendicular, la o distanță de 2 mm. Plăcile au fost incubate la 28°C timp de 24-48 ore. Testul a fost repetat de cinci ori. Rezultatul pozitiv s-a apreciat prin apariția zonelor de inhibiție. Tulpina Pss 33 a inhibat *in vitro* creșterea fitopatogenilor care afectează pomii fructiferi la înflorit (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* ice+).

Testul *in situ* s-a realizat prin determinare interacțiilor microbiene pe flori detașate. Modelul experimental utilizat a fost cel al florilor izolate (Pusey, 1997). Ramuri de măr cu muguri au fost tăiate din copaci cu 4-5 zile înainte de înfloritului și depuse la 4°C, cu baza imersată în apă. La startul experimentelor ramurile au fost scoase de la frigider și menținute la temperatura camerei (20 ... 23°C). Mugurii floralii s-au deschis în două zile. Conform protocolului florile deschise (petale și anterele roșii) au fost prelevate cu pedunculul intact (1,5 cm lungime) și plasate în tuburi de microcentrifugă, cu capătul bazal al pedunculului scufundat într-o soluție sterilă de 20% zaharoză. Peste florile astfel pregătite au fost pulverizate suspensii 10⁶ ufc/ml din tulpinile antagoniste testate. Suspensiile au fost preparate în tampon fosfat 10 mM cu 0,03% Tween 20. Tuburile Eppendorf au fost depuse în rack-uri, iar rack-urile cu flori inoculate au fost transferate în cutii de plastic de 10 l, pe al cărui fund era depozitată o soluție de glicerină 40% (pentru menținerea unei umidități de 93 ... 94%). Concomitent cu tratamentul cu bacterii antagoniste (în funcție de varianta testată) peste florile detașate s-a adăugat o suspensie 10⁶ ufc bacterii fitopatogene (*Erwinia amylovora* NCAIM B 01108 și *Pseudomonas syringae* ATCC 53543). S-a incubat la 20°C (*Erwinia amylovora*) sau la 0°C (bacteriile care nuclează gheața). După 24 ore s-au făcut notări de eficacitate, conform unei scări de eficacitate cu note de la 0 la 5, conform următoarei scări: 0 - distrugere totală a florilor; 1 - 80... 90% din flori distruse; 2 - 60 ... 80% din flori distruse; 3 - 40 .. 60% din flori distruse; 4 - 20 ... 40% din flori distruse; 5 - 0 ... 20% din flori distruse.

Rezultatele sunt prezentate în tab. 6, comparativ pentru *Serratia plymuthica* Ps33 cu alte tulpini din colecția de lucru. Aceste rezultate demonstrează o foarte bună eficacitate *in situ* a tulpinii Ps33 în combaterea bacteriilor care afectează pomii fructiferi la înflorit.



Tab. 6. Acțiunea biologică *in situ* față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit.

Codificare	Tulpina	Eficacitate <i>in situ</i> față de <i>E. amylovora</i> ^a	Eficacitate <i>in situ</i> față de <i>P. syringae</i> ice ^{+b}
P10	<i>Pseudomonas</i> sp (posibil <i>P.aeruginosa</i>)	3	2
P11	<i>Pseudomonas</i> sp	2	2
P14	<i>Pseudomonas</i> sp (posibil <i>P.aeruginosa</i>)	1	3
P18	<i>Pseudomonas</i> sp	2	4
P20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	1
P22	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	4	3
P23	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128	4	1
Bw	<i>Bacillus</i> sp.	2	3
BCPC	<i>Bacillus</i> sp.	3	4
B40	<i>B. licheniformis</i>	4	1
B2R	<i>B.subtilis</i>	4	2
B005	<i>B.subtilis</i>	3	2
B30	<i>B.subtilis</i>	4	5
Lob1b	<i>B.subtilis</i>	2	1
Sal1	<i>B.subtilis</i>	3	3
R3P5M	<i>Bacillus</i> sp.	3	2
R6P4G	<i>Bacillus</i> sp.	2	1
R9P7M	<i>Bacillus</i> sp.	1	2
R11P5M	<i>Bacillus</i> sp.	0	2
R3P5P	<i>Bacillus</i> sp.	1	2
Ps33	<i>Serratia plymuthica</i>	5	4

a,b) notări de la 0 la 5 conform următoarei scări: 0 - distrugere totală a florilor; 1 - 80... 90% din flori distruse; 2- 60 ... 80% din flori distruse; 3 - 40 .. 60% din flori distruse; 4 - 20 ... 40% din flori distruse; 5 - 0 ... 20% din flori distruse.

Rezultatele prezentate mai sus demonstrează o activitate superioară în cadrul testelor *in vivo* și *in situ* față de testele *in vitro*. Această caracteristică este explicată de capacitatea ridicată a bacteriile din genul *Serratia* de a forma biofilme pe organele subterane ale plantelor (Liu *et al*, 2007, FEMS Microbiol Lett. 270,299–305). Capacitatea de a forma biofilme este dependentă de sensibilitatea de grup mediată de semnalele AHL (Van Houdt *et al.*, 2007, FEMS Microbiol Rev. 31, 407–424). S-au realizat diferite teste pentru a se determina producerea de semnale QS (AHL) de către bacteriile *S. plymuthica* Ps33 și producerea de biofilme pe diferite suprafețe.

Pentru evidențierea moleculelor implicate în sensibilitatea de grup (*quorum sensing*) s-au folosit două tulpini biosenzor, *Chromobacterium violaceum* CV026 și *A. tumefaciens* NT1.

Tulpina mutantă CV026 a fost obținută din tulpina sălbatică *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, și este folosită ca biosenzor pentru detectarea moleculelor de tip AHL. *Chromobacterium violaceum* CV026 produce pigmenti de culoare violetă, numiți violesceină, doar atunci când în mediu sunt prezente molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei de acil între C₄ și C₈.

Agrobacterium tumefaciens NT1 este o bacterie mutantă, obținută din tulpina sălbatică, prin fuzinarea genei Tra cu gena LacZ. Astfel gena LacZ nu mai poate sintetiza molecule de AHL, și astfel nu poate fi activată enzima β-galactozidază. Prin urmare X-galul prezentă în mediu nu poate fi descompusă de către *Agrobacterium tumefaciens* NT1, și astfel mediul nu se decolorează. Dacă AHL este prezent în mediu (ex. fiind sintetizată de alte bacterii), atunci apare o culoare albastru-verzui. Tulpina biosenzor de *A. tumefaciens* NT1 produce pigmenti de culoare verzuie-albăstruie doar atunci când în mediu sunt detectate molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei de acil între C₄ și C₁₂.

Tulpina Ps33 de *S. plymuthica* și tulpinile biosenzor CV026 și NT1 au fost împrăștiate pe mediul agarizat Luria-Bertani (10g bacto-triptonă; 5g extract de drojdii; 10g NaCl; 20g agar-agar; pH 7.2, sterilizat 20 minute la 121°C) cu 24 de ore înainte de utilizare. În cazul tulpinilor biosenzor mediul LB s-a suplimentat cu cloramfenicol (concentrație finală de 5 μg/ml) sau kanamicină (concentrație finală de 50 μg/ml).

Testul propriu-zis a constat în trasarea unui striu, în centrul unei plăci Petri, cu tulpina biosenzor CV026 sau NT1 apoi, perpendicular pe aceasta, s-a striat tulpina Ps33 la o distanță de 3 mm fata de tulpina martor. Plăcile s-au incubat la 28°C și au fost analizate la 24 ore. Apariția culorii violet în zona de creștere a tulpinii Cv026, respectiv a culorii verzi în zona de creștere a tulpinii NT1, a indicat prezența moleculelor de acil-homoserin-lactonă produse de tulpina Ps33. Testul a fost repetat de trei ori, cu ambele tulpini biosenzor. De fiecare dată s-a evidențiat apariția culorii specifice diferitelor tulpini biosenzor, fapt care demonstrează producerea de către tulpina Ps33 de molecule de N-acil-homoserin-lactonă (AHL), care au lungimea grupei acil între C₄ și C₁₂.

Capacitatea de formare de biofilme *in vitro* a fost analizată prin metoda spectrofotometrică. Bacteriile Ps33 au fost crescute pe mediu lichid LB, la 28°C,



până la atingerea unei densități optice $OD_{595}=2.0$. Aceste culturi s-au transferat apoi aseptice pe plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, cu 8 repetiții din fiecare tip de tulpină testată.

Plăcile s-au incubat la 25°C pentru 24 de ore. Turbiditatea celulelor se determină folosind un reader de plăci de microtitrare. După perioada de incubare de 24 de ore, mediul lichid s-a spălat de 3 ori cu apă sterilă pentru a se îndepărta bacteriile slab asociate. Plăcile s-au uscat la temperatura camerei timp de 45 de minute, după care s-a colorat fiecare godeu cu o soluție de 0,1% de verde malachit timp de 20 de minute. S-a spălat colorantul de 3 ori cu apă sterilă, și s-a observat biofilmul colorat în verde. Analiza cantitativă s-a realizat prin spălarea colorantului cu etanol, și cuantificarea prezenței verdelui malachit cu reader de plăci de microtitrare la 630 nm (verdele malachit având absorbanta maximă la 620 nm). Rezultatele obținute pentru diferite tulpini testate sunt prezentate în tab. 7, comparativ pentru tulpina Ps33 și pentru alte izolate testate. Se remarcă faptul că tulpina Ps33 produce o cantitate semnificativă de biofilm *in vitro*.

Tab. 7. Valorile absorbantei colorantului verde de malachit eliberat din biofilmele formate pe pereții godeurilor din placa de microtitrare.

nr.	martor	I12	I16	I15	KG16	Ps33	Ps23	Ps43	B60	B92	B34	B52
1	0,05	0,17	0,09	0,23	0,13	0,48	0,16	0,32	0,33	0,12	0,45	0,37
2	0,04	0,12	0,07	0,18	0,08	0,54	0,05	0,35	0,32	0,15	0,42	0,39
3	0,07	0,1	0,13	0,21	0,09	0,56	0,11	0,22	0,3	0,13	0,27	0,38
4	0,05	0,12	0,09	0,11	0,1	0,52	0,07	0,31	0,29	0,13	0,42	0,4
5	0,08	0,09	0,1	0,14	0,09	0,47	0,12	0,29	0,26	0,12	0,37	0,33
6	0,06	0,05	0,07	0,18	0,07	0,55	0,07	0,21	0,33	0,1	0,25	0,26
7	0,07	0,13	0,1	0,15	0,09	0,54	0,12	0,2	0,31	0,12	0,34	0,33
8	0,08	0,2	1,12	0,25	0,1	0,58	0,19	0,33	0,29	0,22	0,39	0,33
medie	0,06	0,12	0,22	0,18	0,09	0,53	0,11	0,28	0,30	0,14	0,36	0,35

Pentru testarea producerii *in situ* de biofilme s-a lucrat pe varianta determinării biofilmului format pe nisip. Într-o placă cu 24 godeuri s-au adăugat 0,5 ml de nisip steril (granulație fină 0,2 ...0,4 mm). Peste acest nisip s-au adus 0,5 ml suspensie bacteriană preparată ca mai jos. Bacteriile Ps33 s-au crescut pe mediu LB până la atingerea unei $DO_{600} = 2.0$. S-a spălat și s-a resuspendat în același mediu. S-a incubat la 28°C. După 48 ore s-au prelevat aseptice 0,1 ml de amestec nisip - mediu de cultură, s-au adus într-un tub de centrifugă steril cu masă cunoscută, s-a centrifugat și s-a îndepărtat aseptice supernatantul. S-a



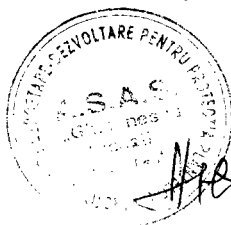
cântărit nisipul depus centrifugal în fiecare din cele 24 tuburi de centrifugă. S-au adăugat apoi 0,15 ml soluție 10mM MgSO₄ în toate tuburile și s-a vortexat. Din supernatantul în care s-au reluat bacteriile s-a determinat numărul de ufc prin tehnica diluțiilor.

Tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* a fost comparată din punct de vedere al capacității de formare biofilme cu tulpina HRO-C48 (= DSMZ12502), tulpină recunoscută pentru capacitatea de protecție a rizosferei plantelor prin formare de biofilme (Liu *et al*, 2007, FEMS Microbiol Lett. 270,299–305). Din tulpina Ps33 s-au recuperat $7,5 \cdot 10^8 \pm 1,1 \cdot 10^7$ ufc g⁻¹ de nisip, comparativ cu $2,8 \cdot 10^8 \pm 5,2 \cdot 10^7$ ufc pentru tulpina HRO-C48.

Pentru testarea capacității de formare de biofilme *in situ* pe organele plantei s-a lucrat cu testul reisolării de pe rădăcinuțele plantulelor de grâu. Bacteriile au fost cultivate peste noapte pe mediu lichid LB. S-a normalizat suspensia la $2 \cdot 10^8$ ufc/ml cu mediu LB steril, iar din această suspensie s-au depus 10 μl pe rădăcinuțele unor plante de grâu gnotobiotice (provenite din substanțe de grâu dezinfectate la suprafață, germinate timp de 5 zile în condiții aseptice). Depunerea s-a realizat pe colet, la marginea dintre rădăcinuță și cotiledon. S-a incubat timp de 24 ore, după care rădăcinuța a fost detașată steril din plantulă și depusă aseptically într-un tub de centrifugă. Peste rădăcinuță s-au adăugat 0,15 ml soluție 10mM MgSO₄ și s-a vortexat pentru 5 minute. Supernatantul s-a reluat prin sucțiune, iar rădăcinuța a extrasă din tubul de centrifugă și fost uscată prin depunere aseptically pe hârtie de filtru sterilă. Rădăcinuța uscată a fost depusă aseptically pe mediu semisolid CM-agaroză (10 g/l casaminoacizi, 10 g/l manitol, 3 g/l agaroză), suplimentat cu 10 ml soluție sterilă nutritivă. Soluția sterilă nutritivă a fost obținută prin diluarea de 100 ori a unei soluții stoc (H metal) și sterilizarea prin filtrare. Pentru obținerea a 200 ml de soluție stoc H metal s-a procedat după cum urmează. S-au obținut 100 ml soluție de lucru prin diluare de 500 ori a unei soluții stoc care conținea: 1,5 g CaCl₂ · 2H₂O, dizolvată mai întâi; 50 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g MnSO₄ · H₂O, 100 mg CoCl₂ · 6H₂O, 100 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O, 50 mg CuSO₄ · 5H₂O, 50 mg ZnSO₄ · 7H₂O și 20 mg H₃BO₃. La acești 100 ml soluție s-au adăugat 50 mg FeSO₄ · 7H₂O și 50 mg acid ascorbic.

Din rădăcinuțe s-au obținut colonii dendritice, al căror aspect specific demonstrează existența unor caracteristici de mobilitate asociate formării de biofilme pe organele subterane ale plantelor de cultură.

Tulpina Ps33 a fost testată în ceea ce privește mobilitatea de migrare la suprafața agarului (*swimming*) și de agregare (*swarming*). Ca martor, a fost



utilizată o tulpină modificată genetic pentru a fi imobilă, *P. putida* PCL1760 (Validov, 2007). Bacteria a fost înprospătată pe mediul LB suplimentat cu 1,8% agar și crescută peste noapte la 28°C. Petriuri cu 25 ml mediu LB suplimentat cu 0,3% agar, pentru *swimming* și cu 0,5% agar pentru *swarming* au fost preparate și lăsate să se usuze pentru 20-30 minute în hota cu flux laminar înainte de utilizare. Tulpina de analizat a fost inoculată prin înțepare în centrul mediului cu betișoare sterile din lemn. După 18 ore de incubare la 28°C, plăcile au fost analizate în ceea ce privește mobilitatea. Rezultatele au reflectat, în cazul tulpinii Ps33, prezența ambelor tipuri de mobilitate. Mobilitatea are un rol major în colonizarea rădăcinilor plantelor și este factorul direct implicat în mecanismul de combatere biologică prin competiție pentru nutrienți și spațiu.

Producerea de compuși volatili cu rol în fitostimulare a fost demonstrată prin determinarea producerii de acetoină. Acetoina (3-hidroxi-2-butanona, HB) este un metabolit fiziologic important excretat de e microorganisme atunci când sunt crescute într-un mediu de cultură conținând glucoză sau alte surse de carbon degradabile pe calea Embden - Meyerhof. Formarea acetoinii este pusă în evidență prin reacția Voges-Proskauer și servește drept marker în clasificarea microbiană având un rol important în reglarea ratei NAD/NADH și în stocarea carbonului. Producerea de acetoină demonstrează și capacitatea respectivelor tulpini de a produce 2,3-butandiol, compus volatil cu rol în stimularea creșterii plantelor. tulpina Ps33 a fost crescută 24 ore în LB (incubată la 28°C cu agitare), apoi 100μl cultură au fost inoculați în 5ml mediu lichid cu glucoză (proteoză - peptonă...7g, glucoză...5g, NaCl...5g, apă distilată ...1000ml), distribuit în eprubete, sterilizat 15 minute la 1 atm. Cultura a fost preparată în 3 repetiții și testată pentru producerea de acetoină la 3, 5 și 7 zile după inoculare și incubare la 28°C. Ca reactiv, s-a utilizat o soluție 10%NaOH, câte 1ml distribuit în fiecare eprubetă și, ulterior, adăugarea în fiecare eprubetă a 1mg de creatină, mixtura fiind agitată viguros. Apariția culorii roșii, după 30-60 minute, la temperatura camerei, a indicat prezența acetil-metil-carbinolului, deci o reacție pozitivă.

Intr-o altă serie de experiment s-a testat capacitatea bacteriilor Ps33 de a solubiliza fosforul din compușii săi insolubili. Pentru determinarea capacității de solubilizare a fosforului mineral s-a utilizat mediul agarizat Pikovskaya, care conține (per litru): 0,5 g extract drojdie, 10 g glucoză, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 0,5 g (NH₄)₂SO₄, 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO₄.7H₂O, 0,0001 g MnSO₄.H₂O, 0,0001 g FeSO₄.7H₂O și 15 g agar. Pe acest mediu bacteriile tulpinii Ps33 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat fosforul mineral.



Capacitatea de a solubiliza fosforul organic s-a testat pe mediul PSM (phytate screening medium), care conține (per litru): 10 g glucoză, 4 g fitat de sodiu, 2 g CaCl_2 , 5 g NH_4NO_3 , 0,5 g KCl , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15 g agar. Si pe acest mediu bacteriile tulpinii Ps33 au produs halou în jurul coloniilor, deci au solubilizat și fosforul organic din fitați.

Activitatea de stimulare a creșterii plantelor a tulpinii Ps33 a fost pusă în evidență prin efectuarea de experimente în condiții controlate, folosind plantule de grâu, *Triticum aestivum*, cv. Alex. În vederea inoculării, cariopsele de grâu au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 de secunde cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă.

Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4 %, timp de 15 minute. Ulterior, au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 in 25 de minute, timp de două ore. Cariopsele astfel dezinfectate au fost păstrate la 4°C, la întuneric, pe hârtie de filtru umectată. Tulpina Ps33 a fost cultivată pe mediu LB lichid la 28°C și 150 rpm timp de 16 ore. Inocularea semințelor s-a realizat la două concentrații, de 10^6 sau 10^8 ufc/ml. Bacterizarea cariopselor a fost efectuată prin imersare în suspensie bacteriană timp de 15 minute, la temperatura camerei, și agitare la 20 rpm. Ca martor, au fost folosite cariopse de grâu, sterilizate ca mai sus și imersate în apă distilată sterilă.

Cariopsele de grâu inoculate conform metodei descrise mai sus au fost puse la germinat în plăci Petri (cu diametrul de 9,4 cm), pe apă agarizată 0,8%, în număr de 20 de cariopse/placă, în 5 repetiții. Fiecare variantă a constat în 100 cariopse. Temperatura de incubare a fost de 28°C. S-au făcut observații în ceea ce privește numărul semințelor germinate la 24, 48 și 72 de ore.

Pentru determinarea influenței bacteriilor Ps33 asupra dezvoltării plantulelor de grâu, cariopsele de grâu inoculate cu suspensie bacteriană în concentrație de 10^6 sau 10^8 ufc/ml au fost distribuite în vase Petri (cu apă agarizată, diametrul plăcilor de 9,4 cm), câte 10 semințe/placă, în 3 repetiții (30 cariopse per variantă). Peste apa agarizată au fost adăugați câte 5 ml de mediu mediu mineral nutritiv pentru plante cu formula: 0,4 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2,4 g KNO_3 ; 1,6 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,8 g MgSO_4 , agarizat cu 2 g la litru. Plăcile au fost incubate la întuneric, la 28°C. S-au efectuat observații în ceea ce privește efectul de stimulare al creșterii rădăcinuțelor și a plantulelor de grâu după 72 de ore, determinându-se lungimea rădăcinuței și înălțimea plantulei.



Determinările referitoare la influența tulpinii asupra germinării și dezvoltării plantulelor au fost realizate comparativ față de un martor reprezentat de apă distilată sterilă, și față tulpini de bacili cu activitate fitostimulatorie dovedită. Rezultatele, prezentate în tab. 8 și 9, susțin existența unui efect fitostimulator exercitat de bacteriile Ps33 asupra plantulelor de grâu, și în special asupra sistemului radicular.

Tab. 8. Influența inoculului bacterian asupra capacității de germinare a cariopselor de grâu. (cv. Alex).

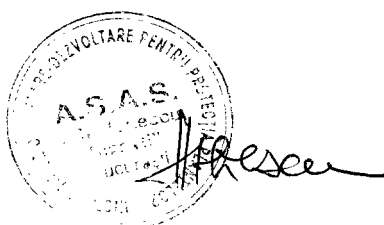
Tulpină bacteriană	Încadrare taxonomică	Concentrație inocul (ufc/ml)	% de cariopse germinate după		
			24 h	48 h	72 h
Mt	apă distilată sterilă	-	75	88	92
B49b	<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁶	79	89	98
FL 400	<i>Paenibacillus graminis</i>	10 ⁶	71	88	88
Ps 33	<i>Serratia plymuthica</i>	10 ⁶	84	89	98

Tab. 9. Testarea efectului de stimulare a creșterii plantelor de grâu (cv. Alex) de către tulpinile de bacterii testate (72 ore post-inoculare)

Tulpină bacteriană	Concentrație inocul (ufc/ml)	Germinație		Nr. răd.	Lungime răd. (cm)	Înalțime plantulă (cm)
		Din 30 sem.	%			
B49b	10 ⁶	24	80	4	3,79	2,02
B49b	10 ⁸	29	96,7	4	3,05	1,89
FL 400	10 ⁸	26	86	3	3,93	2,27
Ps 33	10 ⁶	29	96,7	4	4,05	2,52
Ps 33	10 ⁸	29	96,7	4	3,87	2,43
Mt	-	25	83,3	4	3,68	2,54

DL 5% 0,38 0,27

Pentru a se determina influența tulpinii Ps33 asupra biodisponibilității seleniului pentru plantele de grâu și porumb au fost realizate experimente de seră și câmp. În cadrul experimentelor de seră s-a lucrat cu substrat de creștere (prelivosol roșcat: mranită: nisip - 2:1:1, repartizat în vase de vegetație cu suprafața de 0,050 m² și cu un volum de 15 l), la care s-a aplicat tratamente



ale solului la locul de însămânțare ("în brazdă") în raport de 1 ml per vas de vegetație (corespunzând la 200 l/ha).

Boabele de porumb (PR36D79 Pioneer) și grâu (cv. Boema) au fost dezinfectate prin menținere 5 min în hipoclorit 5% și spălări repetate cu apă distilată. Boabele astfel dezinfectate au fost plasate în vasele de vegetație (2 boabe de porumb într-un singur cuib, 20 boabe de grâu uniform distribuite). La locul de însămânțare a fiecărui bob s-au aplicat tratamente cu soluția de aplicare, 1 ml pentru cele două boabe de porumb, câte 50 μ l pentru fiecare bob de grâu. Soluția de aplicare conținea 10^7 sau 10^8 ufc tulpina Ps33, 3,0g/l zaharoză; 0,5g/l K_2HPO_4 ; 0,2g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g/l NaCl; 7 g/l plasmolizat de drojdie suplimentat cu 100 ± 5 mg Se/100 plasmolizat 0,5g/l glutamat de sodiu; 0,2g/l K_2MoO_4 . Bacteriile au introduse ca suspensie concentrată în soluția obținută prin dizolvarea pe rând a fiecăruia ingredient în apă dură standard (considerată în literatura de specialitate ca fiind un etalon pentru apa de fântână).

Apa dură standard s-a obținut prin amestecarea a 68,5ml soluție A cu 17ml soluție B într-un berzelius de 1000ml. S-a diluat apoi cu circa 800ml apă distilată și s-a adus pH-ul la 6...7 prin adăugare de NaOH 0,1N. S-a transferat într-un vas cotat de 1000ml și s-a adus la semn cu apă distilată.

Soluția A s-a preparat astfel: S-au cântărit 4g carbonat de calciu și s-au transferat într-un flacon conic de 50ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat încet 82 ml HCl 1N, agitând conținutul. Când tot carbonatul de calciu s-a dizolvat, s-a diluat soluția la circa 400ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de amoniac 1N până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000ml.

Soluția B s-a preparat astfel: s-au cântărit exact 1,613g oxid de magneziu și s-au transferat într-un flacon de 500ml cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat 82 ml HCl 1N. S-a reîncălzit încet până la dizolvare, s-a diluat la circa 400ml cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO_2 . S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat două picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1N până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000ml, s-a adus la semn cu apă distilată și s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă

Variantele experimentale care au fost realizate sunt:

V₁ – martor netratat cu (semințe / sol);

V₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat;



V₃ – sol tratat "în brazdă" cu *Serratia plymuthica* Ps33 10⁷ în soluția de aplicare;
 V₄ - sol tratat "în brazdă" cu *Serratia plymuthica* Ps33 10⁸ în soluția de aplicare
 V₅ – martor tratament foliar ziua a 14-a de la răsărire (5 ml soluție 0,1 mg% Se sub formă de selenat de sodiu, echivalent a 10 g/ha seleniu).

Din experimentele realizate s-au recoltat cca. 2..3 g de material vegetal, atunci când grâul a ajuns la faza de înfrățire, respectiv când porumbul a ajuns în faza de 8 frunze complete. Materialul vegetal s-a cântărit cu o precizie de 1 mg și s-a adus într-un balon cu dop rodat de 250 cm³. S-au adăugat 20 cm³ de acid azotic concentrat și s-a lăsat 2 zile la temperatura camerei. După aceea s-au adăugat 2 cm³ acid percloric concentrat; iar la balon s-a atașat un refrigerent cu spirală. S-a pus pe baie de nisip cu temperatura de 180 °C, la nișă chimică și s-a fiert timp de 16 ore. S-a demontat refrigerentul, sa-u adăugat 1 cm³ de acid sulfuric concentrat, după care s-a continuat evaporarea sub nișă cca. 3 ore, până la un volum de 1-2 cm³. Soluția s-a răcit, s-a adăugat 1 cm³ de acid azotic concentrat și s-a ținut pe baia de apă timp de 10 minute. Mineralizatul astfel obținut s-a transvazat cantitativ într-un pahar Berzelius de 100 cm³. La proba astfel dezagregat s-au adăugat 5 cm³ soluție de mascare după care pH-ul soluției s-a adus la 2 cu soluție de hidroxid de amoniu. S-au adăugat 5 cm³ de soluție 0,1% 2,3-diamino-naftalină după care s-a lăsat în întuneric două ore. După formarea complexului soluția s-a transvazat cantitativ într-o pâlnie de separare. Complexul piaszelenolic format a fost extras repetat cu ciclohexan 2x5 cm³ agitând intens 2 minute. Fazele organice s-au reunit și s-a determinat fluorescența la o lumină de excitare de 380 nm și la o emisie de 519 nm. Rezultatele obținute sunt prezentate în tab. 10. Ele demonstrează că tulpina Ps33 este o tulpină care are capacitate ridicată de a biodisponibiliza seleniul pentru plantele de grâu și porumb.

Tab.10. Nivelele de seleniu total (μg/kg) în țesuturile plantelor provenite din semințe tratate "în brazdă" cu o soluție seleniată și tulpina Ps33

Varianta experimentală	Grâu	Porumb
V ₁ – martor netratat (semințe / sol);	44,3±5,2 ^c	46,3±4,5 ^c
V ₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat	54,6±4,6 ^b	56,7±3,7 ^b
V ₃ – sol tratat "în brazdă" cu <i>Serratia plymuthica</i> Ps33 10 ⁷ în soluția de aplicare	62,2±4,8 ^{ab}	64,6±6,3 ^{ab}
V ₄ - sol tratat "în brazdă" cu <i>Serratia plymuthica</i> Ps33 10 ⁸ în soluția de aplicare	71,6±4,4 ^a	72,5±4,3 ^a
V ₅ – martor tratament foliar ziua a 14	68,8±7,1 ^a	71,2±5,6 ^a



Tulpina Ps33 a fost testată și în cadrul unui experiment de câmp amplasat în Dobrogea, pe suprafețe mari. Bacteriile au fost aplicate în brazdă concomitent cu semănatul prin utilizarea de echipamente agricole specifice de aplicare soluții în brazdă, la presiuni de lucru cuprinse între 0,5 ... 3 bar a echipamentului de aplicare prin pulverizare în brazdă și la o viteză medie de deplasare a agregatului de semănat de 7 km/h. Soluția de aplicare a inclus aceleași componente, care însă au fost dizolvate în apă de fântână. Experimentul a fost realizat în pătrat latin, cu 4 variante în 4 repetiții. Cele 4 variante au fost:

V₁ – martor netratat cu (semințe / sol);

V₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat;

V₃ - sol tratat "în brazdă" cu *Serratia plymuthica* Ps33, 10⁸ în soluția de aplicare;

V₄ – martor tratament foliar ziua la faza de spic în burduf (500 litri soluție 2 mg % Se, sub formă de selenat de sodiu echivalent a 10 g/ha seleniu).

Din experiment au fost prelevate probe în fenofaza de formare a boabelor și la recoltare, probe de boabe. În aceste probe s-a determinat nivelul de seleniu total prin digestia umedă a probelor de sol cu un amestec de acizi azotic, sulfuric, percloric pentru transformarea tuturor speciilor moleculare Se în seleniat (SeO₄²⁻), reducerea acestuia cu NaBH₄ la H₂Se și dozarea lui prin HG-AAS (generare de hidruură cu dozarea seleniului prin spectroscopie de absorbție atomică în flacără). Rezultatele sunt prezentate în tab.11.

Tab.11. Influența tratamentului de inoculare în brazdă cu tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* asupra preluării și acumulării de seleniu (μg/kg).

Varianta experimentală	Material vegetal	Grâu boabe
V ₁ – martor netratat (semințe / sol);	39,5±5,2 ^c	106,3±4,5 ^c
V ₂ - martor tratat "în brazdă" cu soluția de aplicare seleniată, nebacterizat	53,6±4,6 ^{bc}	116,7±5,7 ^b
V ₃ - sol tratat "în brazdă" cu <i>Serratia plymuthica</i> Ps33 10 ⁸ în soluția de aplicare	77,6±4,4 ^a	136,5±7,3 ^a
V ₄ – martor tratament foliar ziua a 14	62,8±7,1 ^b	121,±7,9 ^b

Tulpina Ps33 de *Serratia plymuthica* stimulează acumularea și preluare seleniului de către plantele de grâu în condiții de câmp și poate fi utilizată pentru ameliorarea proceselor de biofortifiere cu seleniu a recoltei de grâu.



Testarea inocuității tulpinilor bacteriene s-a realizat prin utilizarea larvelor de insecte de *Galleria mellonella*. Larvele au fost crescute pe substrat de cultură, la 30°C, substratul având următoarea compoziție: malai 400 g, faina 200 g, tarate de grâu 200 g. Toate aceste componente s-au ținut în congelator timp de 7-10 zile după care, s-au sterilizat prin menținere 70°C timp de 2 ore. La aceste componente sterilizate, s-a adăugat drojdie uscată măcinată 100 g și lapte praf 200 g. La acest amestec pulverulent s-au adăugat 700 ml de amestec lichid, compus din 350 ml miere și 350 ml glicerină în care s-a dizolvat ceară de albine (1:1). Compoziția finală s-a omogenizat la mixer și s-a păstrat în cutie de plastic, la 4°C.

Larvele de vârstă a treia au fost păstrate la 4°C pe substratul menționat mai sus. Pentru infectare, s-a folosit o seringă Hamilton de 5 μl. S-au injectat câte 5 μl de suspensie bacteriană prin partea stângă a ultimului segment. După injectare, larvele au fost plasate în incubator, la întuneric, la 30°C, temperatura optimă pentru creșterea și dezvoltarea lor. Au fost realizate o serie de 10 diluții seriale combinând concentrații bacteriene între 10⁶ și 0, în soluție 10 mM MgSO₄ + 1.2 mg/ml ampicilina, cu care s-au injectat larvele de *G. mellonella*. Concentrația inoculului start a corespuns unei densități optice (DO 600 nm) de 1,435. Larvele martor au fost injectate cu câte 5 μl soluție 10 mM MgSO₄ + 1.2 mg/ml ampicilina pentru a evalua orice potențial efect letal al procesului de injectare. Din fiecare diluție s-au injectat câte 10 larve, fiind efectuate câte trei repetiții/ diluție. Monitorizarea larvelor (moarte, vii) s-a făcut la 48-72 ore după infecție, la 30°C (tab. 12).

Tab. 12. Mortalitate larvelor de *Galleria mellonella* injectate cu suspensii 10⁶ ufc/ml din tulpina de testat.

Varianta	Repetiția	24 ore post-infecție		48 ore post-infecție		72 ore post-infecție		
		vii	moarte	vii	moarte	vii	moarte	crisalide
Martor 10 mM MgSO ₄ + 1.2 mg/ml ampicilina (DO 0,000)	R1	10	0	10	0	10	0	2
	R2	10	0	10	0	9	1	1
	R3	10	0	10	0	9	1	-
Ps33 10 ⁶ ufc/ml	R1	10	0	9	1	8	2	-
	R2	8	2	8	2	8	2	-
	R3	10	0	10	0	9	1	1

Datele din tab. 12 demonstrează faptul că tulpina testată, Ps33, nu prezintă practic patogenitate față de larvele de *Galleria mellonella*, neavând



21-12-2010

capacitatea de a se multiplica în corpul larvelor și de a produce bacteremii, deși au fost injectate în limfa larvelor. Aceste tulpini au o activitate biologică ridicată (antagonism, stimulare a creșterii plantelor, capacitate de biodisponibilizare a seleniului) și nu prezintă caracteristici de patogenitate pentru organisme nețintă. În concluzie această tulpină are potențial de utilizare în practică, atât pentru protecția plantelor împotriva atacului fitopatogeni, cât și pentru biofortifierea recoltei de grâu cu seleniu.



TULPINĂ DE *SERRATIA PLYMUTHICA* CU ACȚIUNI MULTIPLE ASUPRA PLANTELOR DE CULTURĂ

Revendicare

1. Tulpină de *Serratia plymuthica*, Ps33, înregistrată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, cu numărul NCAIM (P) B001366, caracterizată prin aceea că are acțiuni de protecție *in vivo* a plantelor de cultură față de ciupercile fitopatogene de sol, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia bataticola*, *Verticillium dahliae*, și acțiunii antagoniste față de bacteriile care afectează pomii fructiferi la înflorit, *Erwinia amylovora*, pseudomonasuri ice⁺, prezintă mobilitate ridicată și formează biofilme, colonizând suprafețele organelor plantelor și rezistând la factorii adverși de mediu, stimulează dezvoltarea plantelor de grâu datorită producerii de compuși volatili și solubilizării fosforului, biodisponibilizează seleniul pentru plantele de grâu și porumb și favorizează acumularea seleniului în boabele de grâu.



Alheseu